

БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 582.284.3:577.151.5(045)

¹А.С. Бухало, д.б.н., проф.

²О.М. Дуган, д.б.н., проф.

³М.Р. Максимюк, к.х.н., доц.

⁴В.М. Ліновицька, старш. викл.

ФЕРМЕНТАТИВНА АКТИВНІСТЬ ВИЩОГО БАЗИДІАЛЬНОГО ГРИБА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE*

¹Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України

^{2,4}Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

³Національний авіаційний університет

²E-mail: biotech@kpi.ua

⁴E-mail: vmail@bigmir.net

Розглянуто активність ферментів гідролітичного комплексу *Schizophyllum commune* при культивуванні на агаризованих середовищах. Показано вплив компонентів комплексних рідких поживних середовищ (пивне сусло, бурякова меласа, кукурудзяний екстракт, пептон, екстракт кормових дріжджів) на ферментативну активність ендо-1,4-β-глюканази, екзоглюканази та монофенолмонооксигенази. Виявлено штамові особливості культур *S. commune* щодо активності ферментів.

Ключові слова: гідролітичні ферменти, екзоглюканаза, ендо-1,4-β-глюканаза, комплексні рідкі поживні середовища, монофенолмонооксигеназа, редукуючі речовини, якісні кольорові ферментативні реакції, *Schizophyllum commune*.

Постановка проблеми

Вищі базидіальні лігнотрофні гриби є відомими продуцентами сполук лікувально-профілактичного та промислового призначення.

Важливу групу речовин грибного походження, які можуть бути використані в різних галузях промисловості, становлять ферменти. Нині сучасні виробництва широко застосовують ферментні препарати, отримані на основі бактерій та плісеньових грибів, натомість, потужні ферментні комплекси вищих базидіальних лігнотрофних грибів використовуються дуже мало.

Одним з об'єктів, який було б доцільно дослідити з цієї точки зору, є базидіоміцет *Schizophyllum commune*.

Аналіз досліджень і публікацій

Schizophyllum commune є продуцентом, з якого за кордоном виробляють лікарські препарати, які мають протипухлинну, протизапальну, антибактерійну, імуномодулюючу та гепатопротекторну дію.

Із літературних джерел відомо про наявність у *S. commune* ферментів гідролітичного та окиснювального комплексів:

- протеаз [1; 2];
- ендоглюканази;

- β-глюкозидази;
- екзоглюканази;
- ксиланази [3–5];
- монофенолмонооксигенази [6; 7].

Однак інформації щодо ферментативної активності штамів, виділених у чисту культуру з природного середовища на території України немає.

Значна кількість лігноцелюлозних відходів сільського господарства, деревообробної та інших галузей промисловості зумовлює особливу увагу саме до целюлаз та оксидаз, що можуть бути використані для біоконверсії таких субстратів, або як тверді та рідкі поживні середовища для біосинтезу різноманітних біологічно активних сполук. Ці самі ферменти в поєднанні з протеазами можна застосовувати в текстильній та інших галузях промисловості для обробки натуральних матеріалів на різних етапах виробництва.

Таким чином, дослідження ферментів різних класів є актуальним для вивчення фізіологічних та біохімічних особливостей цього гриба та можливості їх практичного застосування.

Мета роботи – виявлення та оцінювання спектра і активності гідролітичних ферментів у вищого базидіоміцету *S. commune* в поверхневій та глибинній культурі.

Для досягнення поставленої мети було:

- визначено наявність ферментів різних класів при культивуванні на агаризованих середовищах;
- відібрано штами за спектром наявних ферментів та проведено культивування глибинним способом на комплексних середовищах різного складу;
- оцінено ферментативну активність штамів залежно від умов глибинного культивування.

Матеріали дослідження

Об'єктом дослідження були 21 штам *S. commune* Fr., отримані з колекції шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України, 8 з яких мають різне географічне походження, а 13 ізолювано авторами з плодових тіл, зібраних у різних регіонах України на стовбурах, гілках та деревині різних порід дерев протягом 2001–2006 рр. Ізолювані штами передано до колекції ІВК і наведено в роботі під її номерами.

Наявність амілази, протеази (казеїнази та желатинази активності), полігалактуронази, пектаттрансцелімінази, уреази, ліпази та целюлази (КМЦ-активність) було визначено для всіх штамів за методиками, описаними П. Моліто-рісом [8].

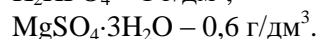
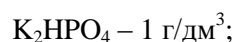
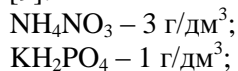
Наявність трьох окиснювальних ферментів (лакази, тирозинази, пероксидази) визначено за допомогою якісних крапельних кольорових реакцій на різних агаризованих поживних середовищах за температури +4, +20, +28, +37 °C [9]:

- картопляно-глюкозному агарі (КГА);
- агаризованому пивному суслі (СА);
- середовищі Норкранс (СН);
- синтетичному середовищі (СС).

Дослідження ферментативної активності проводили в умовах:

- глибинного культивування в колбах Ерлен-меєра на 250 мл;
- постійного перемішування за допомогою орбітальної качалки (180–190 об/хв) за температури (+28 ± 1) °C.

Колби інокулювали отриманою попередньо глибинною культурою в кількості 10 об'ємних відсотків. Як мінеральну основу для комплексних середовищ використовували розчин складу [9]:



Для різних варіантів досліджень як фактор росту та додаткові джерела азоту і вуглецю вносився в кількості еквівалентній 20 г/дм³ глюкози один із таких компонентів:

- пивне сусло;
 - бурякова меляса;
 - кукурудзяний екстракт (КЕ);
 - пептон;
 - екстракт кормових дріжджів (ЕКД).
- Контрольне середовище містило глюкозу.

Протягом культивування на рідких комплексних поживних середовищах було визначено активність целюлолітичних ферментів [10]:

- енд-1,4-β-глюканази за рівнем утворення глюкози в інкубованій суміші з 0,3 % карбоксиметилцелюлози (КМЦ-активність);
- екzogлюканази за рівнем гідролізу фільтрувального паперу (ФП-активність).

В обох випадках кількість глюкози, що утворювалася в результаті дії ферментів визначалася методом Хагедорна – Йенсена [11].

Активність окиснювального ферменту монофенолмонооксигенази встановлювали методом Бояркіна [12]. Відбір зразків відбувався щодоби.

Результати дослідження

Проведені специфічні якісні кольорові реакції показали наявність ензимів, що визначалися, у всіх штамів *S. commune*. У цьому разі спостерігалася різниця в інтенсивності прояву ферментів (табл. 1). Особливо чіткі та інтенсивні позитивні реакції спостерігалися у випадку визначення амілази, целюлази, казеїнази, желатинази та для чотирьох штамів – уреази. Слабкий рівень активності казеїнази виявився тільки у штамів 96, 97, 1769. У штамів 96 та 97 в таких умовах була практично відсутня КМЦ-активність.

Найвищий рівень активності целюлази спостерігався в культурах штамів 441, 1714, 1760. Також у всіх штамів був характерний слабкий або помірний рівень активності полігалактуронази, пектаттрансцелімінази, ліпази та частково уреази.

Визначення наявності групи окиснювальних ферментів, притаманних дереворуйнуючим вищим базидіоміцетам білої гнилі, до яких належить і *S. commune*, проводилося в умовах культивування на різних живильних агаризованих середовищах (табл. 2).

Таблиця 1

Якісні кольорові реакції на наявність ферментів у штамів *S. commune*

Штам	Амілаза	Ліпаза	Целюлаза (КМЦ)	Казеїназа	Желатиназа	Полі-галактуроаза	Пектат-транселіміназа	Уреаза
96	+++	+	±	+	++	±	+	±
97	+++	+	±	+	++	+	+	±
335	+++	+	++	++	++	++	+	+
441	++	+	+++	+++	+++	++	++	++
1590	++	++	++	++	+++	++	+	+++
1713	++	+	++	+++	+++	++	+	++
1714	++	+	+++	+++	+++	++	++	±
1759	++	+	++	++	++	++	+	+
1760	+++	++	+++	+++	++	+	++	+++
1761	+	+	++	+++	++	++	++	+
1762	+++	++	+	+++	++	++	+	±
1763	++	+	++	++	++	+	±	++
1764	++	+	+	++	++	+	±	+++
1765	+++	++	++	+++	+++	±	++	++
1766	+++	++	++	+++	+	++	±	+++
1767	++	+	+	++	+	+	±	±
1768	+	+	+	++	+	+	±	+
1769	+++	++	+	+	++	++	+	+
1770	+	+	+	++	+	+	±	++
1806	+++	++	++	++	+	+	±	+
5009	+	+++	±	++	++	+	+	++

Примітка. ± ледь помітна позитивна реакція; + слабка позитивна реакція; ++ помірна позитивна реакція; +++ інтенсивна позитивна реакція.

Таблиця 2

Якісні кольорові реакції на наявність ферментів окиснювального комплексу на середовищах різного складу у штамів *S. commune*

Штам	Лаказа				Тирозиназа				Пероксидаза			
	СА	КГА	СН	СС	СА	КГА	СН	СС	СА	КГА	СН	СС
96	+	+	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-
97	+	+	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-
335	+	+	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-
441	+	+	+	++	-	-	+	+	+	+	-	±
1590	+	+	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-
1713	+	+	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-
1714	+	+	+	+	-	-	±	+	±	+	-	+
1760	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1761	++	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1762	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1763	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1764	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1765	++	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1766	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1767	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
1806	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
5009	++	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-

Примітка. - відсутність позитивної реакції; ± ледь помітна позитивна реакція; + помірна позитивна реакція; ++ інтенсивна позитивна реакція.

Усі штами *S. commune* виявляли позитивну реакцію на лаказу та пероксидазу на середовищах рослинного походження – СА та КГА. При цьому, якщо наявність пероксидазної активності на СА та КГА майже не залежала від штаму, то у штамів 1761, 1765, 5009 відмічено інтенсивнішу реакцію на лаказу на СА.

На обох синтетичних середовищах слабка позитивна реакція на пероксидазу та тирозиназу спостерігалася тільки у штамів 441, 1714, а на лаказу – у 441, 1714, 5009.

Вплив температури на окиснювальні ферменти виявлявся тільки у швидкості прояву відповідної реакції. Зокрема, за температури +28, +37 °C позитивна реакція проявлялася через 25-30 хв, що в 1,5-2 рази швидше ніж за температури +20 °C.

Найповільнішими були якісні ферментативні реакції за температури +4 °C, які виявлялися через 3-4 год.

Аналіз отриманих результатів свідчить про наявність у *S. commune* таких ферментів:

- амілази;
- протеази;
- полігалактуроази;
- пектаттрансєлімінази;
- уреази;
- ліпази;
- целюлази.

Крім того, виявлено незначний штам – специфічний прояв якісних кольорових реакцій на лаказу, пероксидазу, тирозиназу та залежність наявності реакції від складу агаризованого поживного середовища.

Сприятлива для росту міцелію температура +28 °C, так само як і +37 °C, призводила до прискорення ферментативних реакцій. Натомість, нижчі температури +20 °C та +4 °C сповільнювали її проходження в 1,5-2 та 6-8 разів відповідно.

За результатами досліджень спектра ферментів, що були у штамів для подальшої роботи в глибокій культурі обрано *S. commune* 441, 1714, 1760, 5009.

Наступним етапом було дослідження активності таких ферментів, як ендо-1,4-β-глюканази, екзоглюканази та монофенолмонооксигенази при культивуванні обраних штамів *S. commune* на рідких комплексних поживних середовищах.

Динаміка ендо-1,4-β-глюканази (КМЦ-активність) у штамів 441 та 1714 мала схожий характер протягом усього дослідженого терміну культивування на всіх середовищах (див. рисунок а, б, в, г). Вища активність цього ферменту в обох штамів становила від (238 ± 13) до (374 ± 21) $\mu\text{M}/(\text{год} \cdot \text{см}^3)$ і спостерігалася на другу добу.

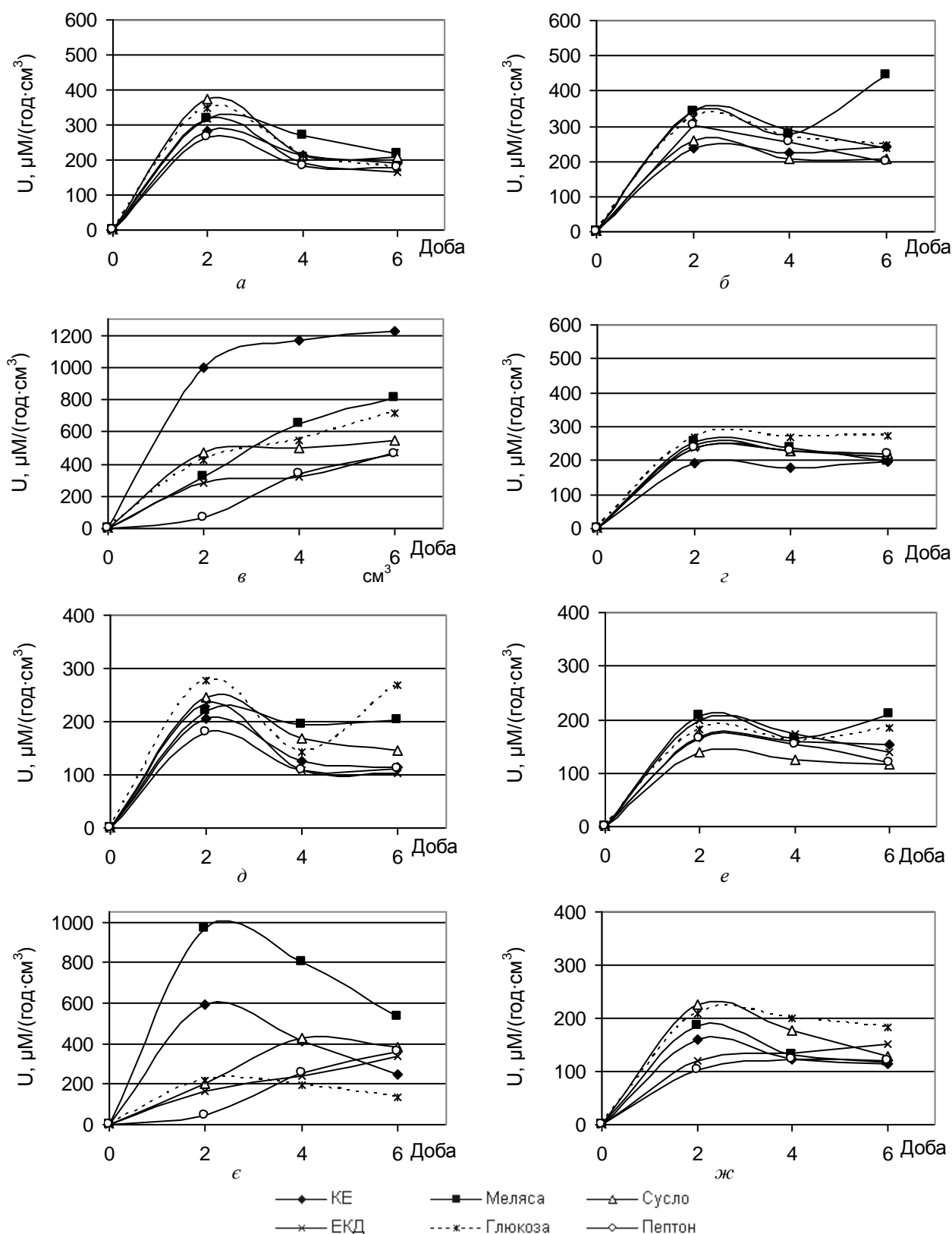
Крім того, для штаму 1714 на середовищі з мелясою збільшення активності до (445 ± 28) $\mu\text{M}/(\text{год} \cdot \text{см}^3)$ припадало також і на шосту добу. КМЦ-активність штаму 5009 також була порівняно невисокою до (270 ± 26) $\mu\text{M}/(\text{год} \cdot \text{см}^3)$ на всіх середовищах.

Різноманітну динаміку ендоглюканазної активності, що залежала від середовища, показав тільки штам 1760. Найсприятливішим було середовище з кукурудзяним екстрактом, на якому на шосту добу КМЦ-активність становила (1223 ± 48) $\mu\text{M}/(\text{год} \cdot \text{см}^3)$.

У більшості випадків рівень активності ендо-1,4-β-глюканази був вищим у 1,2-1,5 рази на середовищах з компонентами рослинного походження, що містять вуглеводи (мелясою, КЕ, суслон).

Активність екзоглюканази у *S. commune* на цих комплексних середовищах змінювалася схожим чином (див. рисунок д, е, є, ж). У штамів 441, 1714, 5009 ФП-активність збільшувалася на другу добу до (278 ± 20) $\mu\text{M}/(\text{год} \cdot \text{см}^3)$ на всіх середовищах. При цьому, хоча найбільша екзоглюканазна активність у штаму 1760 припадала на другу добу тільки на середовищах з мелясою та КЕ (970 ± 42) та (593 ± 24) $\mu\text{M}/(\text{год} \cdot \text{см}^3)$ відповідно, на інших середовищах рівень активності був також вищий порівняно з іншими штамми.

Базидіоміцет *S. commune* належить до ксилотрофів, що викликають білу гниль деревини, тобто здатний до окиснювальної деструкції як целюлози, так і лігніну. Одним із ферментів, що каталізують цей процес, є монофенолмонооксигеназа (лаказа). У досліджуваних штамів лаказна активність, хоча й проявлялася, була слабкою – посиніння субстрату (бензидин) спостерігалася через 30-40 хв інкубування з культуральним фільтратом. Така низька активність, порівняно з даними, наведеними в роботах [6; 7], зумовлена відсутністю в середовищах потрібної кількості лігнінових сполук, необхідних як індуктор.



Динаміка екзоклітинної КМЦ-активності (а, б, в, г) та екзоглюканаз (д, е, є, ж) штамів *S. commune*:

а, д – штам 441;

б, е – штам 1714;

в, є – штам 1760;

г, ж – штам 5009

Отже, прояв та рівень активності целюлолітичних і окиснювальних ферментів у культуральному фільтраті залежить і від штаму, і від складу середовища та пов'язаний з наявністю речовин-індукторів і хімічною природою сполук, що є живильними компонентами для гриба.

Висновки

Проведено дослідження спектра та активності ферментів гідролітичного комплексу при культивуванні вищого базидіального гриба *S. commune* на агаризованих та рідких середовищах різного складу.

Установлено, що при глибинному культивуванні на комплексних поживних середовищах сприятливими були середовища з компонентами рослинного походження (мелясою, KE, суслом), що містять вуглеводи, які індукують целюлазну активність. Максимальне значення КМЦ-активності становило у штаму 1760 на другу добу культивування (1223 ± 48) $\mu\text{M}/(\text{год} \cdot \text{см}^3)$ на середовищі з KE.

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що *S. commune* виявляє високу фізіологічну активність на запропонованих середовищах, які містять відходи сільськогосподарської та переробної галузі (KE та меляса), тому саме такі середовища можуть бути рекомендовані для отримання міцеліальної біомаси, біологічно активних екзопродуктів та посівного матеріалу.

Література

1. Hummel K.M. Extracellular protease production by submerged cultures of *Schizophyllum commune* / Katrina M. Hummel, Amy L. Inselman, Erica R. Ramos et al // Mycologia. - 1998. - Vol. 90, N 5. - P. 883-889.
2. Pandee P. Production and properties of a fibrinolytic enzyme by *Schizophyllum commune* BL23 / Patcharaporn Pandee, Aran H-Kittikul, Oh-sugi et al // Songklanakarin J. Sci. Technol. - 2008. - Vol. 30, N 4. - P. 447-453.
3. Subramaniyan S. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, Application / S. Subramaniyan, P. Prema // Critical Reviews in Biotechnology. - 2002. - Vol. 22, N 1. - P. 33-46.
4. Kolenová K. Purification and characterization of two minor endo- β -1,4-xylanases of *Schizophyllum commune* / Katarína Kolenová, Mária Vršanská, Peter Biely // Enzyme and Microbial Technology. - 2005. - Vol. 36, N 7. - P. 903-910.
5. Wu J. β -glucosidase derived from *Schizophyllum commune* an efficient enzyme of biotransformation of genistein / J. Wu, W. Yu, X. Zhang // Book of abstracts the 5th International Medicinal Mushroom Conference. Nantong, China, 5-8 September, 2009. - P. 139-140.
6. Baldrian P. Fungal laccases: occurrence and properties / P. Baldrian // FEMS Microbial Rev. - 2006. - Vol. 30. - P. 215-242.
7. Kenkebashvilli N. Effect of nutrient medium composition on laccase and manganese peroxidase activity in medicinal mushrooms / N. Kenkebashvilli, V. Elisashvilli, Y. Hadar // International Journal of Medicinal Mushrooms. - 2009. - Vol. 11, N 2. - P. 191-198.
8. Molitoris H.P. Physiology of marine fungi. A screening program for marine fungi / H.P. Molitoris, K. Schaumann // The biology of marine fungi. Eds. S.T. Moss. - Cambridge : Cambridge University Press, 1986. - P. 35-47.
9. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С. Бухало. - К.: Наукова думка, 1988. - 144 с.
10. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии: справ. / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др. - К.: Наукова думка, 1982. - 561 с.
11. Тодоров И.И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии / И.И. Тодоров. - София: Медицина и физкультура, 1968. - 230 с.
12. Гавриленко В.Ф. Большой практикум по физиологии растений / В.Ф. Гавриленко, М.Е. Ладыгина, Л.М. Хандобина. - М.: Высш. шк., 1975. - С. 284-285.